

07.06.00

日本国特許庁 JP00/3687

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

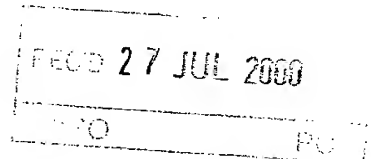
70

4
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年11月30日



出願番号
Application Number:

平成11年特許願第340523号

出願人
Applicant(s):

北興化学工業株式会社
財団法人微生物化学研究会

09/980453

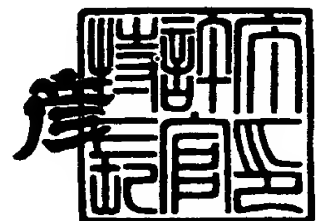
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 6月29日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特2000-3054133

【書類名】 特許願

【整理番号】 11539

【提出日】 平成11年11月30日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07C

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県川崎市多摩区宿河原2丁目42番25-201号

 【氏名】 高橋 篤

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区みたけ台7番地16

 【氏名】 神辺 健司

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県厚木市戸田2385番地 北興化学厚木寮

 【氏名】 森 哲也

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県厚木市戸田2385番地 北興化学厚木寮

 【氏名】 北 雄一

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県大和市中央林間5丁目18番4号

 【氏名】 玉村 健

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都品川区東五反田5丁目1番11号 ニューフジマ
ンション701

 【氏名】 竹内 富雄

【特許出願人】

 【識別番号】 000242002

 【氏名又は名称】 北興化学工業株式会社

 【代表者】 山本 佳彦

【特許出願人】

【識別番号】 000173913

【氏名又は名称】 財団法人 微生物化学研究会

【代表者】 梅澤 純夫

【代理人】

【識別番号】 100066452

【弁理士】

【氏名又は名称】 八木田 茂

【選任した代理人】

【識別番号】 100064388

【弁理士】

【氏名又は名称】 浜野 孝雄

【選任した代理人】

【識別番号】 100067965

【弁理士】

【氏名又は名称】 森田 哲二

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008796

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9102743

【包括委任状番号】 9102652

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ミオーイノシトールからエピーイノシトールの製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ミオーイノシトールを L-エピーイノソース-2 へ変換できる変換能を有するグラム陰性細菌を水性媒質中でミオーイノシトールに作用させて、ミオーイノシトールの L-エピーイノソース-2 への変換により L-エピーイノソース-2 を生成する工程と、前記の工程で生成された L-エピーイノソース-2 を含有する水性媒質から該細菌の菌体を除去して、得られた L-エピーイノソース-2 含有の水性媒質を取得する工程と、該水性媒質から L-エピーイノソース-2 を単離した後に、または単離せずに、L-エピーイノソース-2 を水性の溶媒中で還元剤として添加された水素化ホウ素アルカリ金属、水素化トリアルコキシホウ素アルカリ金属またはシアン化水素化ホウ素アルカリ金属で還元してエピーイノシトールおよびミオーイノシトールを生成する工程と、その還元反応の反応液から、エピーイノシトールおよびミオーイノシトールを回収する工程と、回収されたエピーイノシトールとミオーイノシトールを相互から分離する工程とを有することを特徴とするエピーイノシトールの製造方法。

【請求項 2】 使用されるグラム陰性細菌がシュードモナダセア (Pseudomonadaceae) 科のキサントモナス (Xanthomonas) 属またはシュードモナス (Pseudomonas) 属の細菌、およびアセトバクテラセア (Acetobacteraceae) 科のアセトバクター (Acetobacter) 属、グルコノバクター (Gluconobacter) 属、およびリゾビアセア (Rhizobiaceae) 科のアグロバクテリウム (Agrobacterium) 属の細菌、およびエンテロバクテリアセア (Enterobacteriaceae) 科のエンテロバクター (Enterobacter) 属、セラチア (Serratia) 属またはエルシニア (Yersinia) 属の細菌、およびパステウレアセア (Pasteurellaceae) 科のパステウレラ (Pasteurella) 属またはヘモフィルス (Haemophilus) 属の細菌から選ばれる細菌である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 請求項 1 に記載のミオーイノシトールを L-エピーイノソース-2 へ変換できる変換能を有する細菌としてキサントモナス・エスピー AB1011 9 株 (FERM P-17382 として工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託) を用いる請

求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】 請求項 1 に記載のミオーイノシトールを L-エピーイノソース-2 へ変換できる変換能を有するグラム陰性細菌を、ミオーイノシトールならびに炭素源および窒素源を含有する液体培地で好氣的に培養しながら、該細菌をミオーイノシトールに作用させて、得られた培養液中に L-エピーイノソース-2 を生成し且つ蓄積させる工程と、その培養液から該細菌の菌体を除去して、生成された L-エピーイノソース-2 を含有する培養上清液を得る工程と、得られた培養上清液から L-エピーイノソース-2 を単離する工程と、単離された L-エピーイノソース-2 を水性の溶媒中に溶解し、次いで還元剤として水素化ホウ素アルカリ金属、水素化トリアルコキシホウ素アルカリ金属またはシアン化水素化ホウ素アルカリ金属を添加して該水性溶媒中で L-エピーイノソース-2 を該還元剤で還元してエピーイノシトールおよびミオーイノシトールを生成する工程と、その還元反応で得られた反応液から、エピーイノシトールおよびミオーイノシトールを回収する工程と、回収されたミオーイノシトールおよびエピーイノシトールを相互から分離する工程とから成る、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】 請求項 1 に記載のミオーイノシトールを L-エピーイノソース-2 に変換できる変換能を有するグラム陰性細菌を、ミオーイノシトールならびに炭素源および窒素源を含有する液体培地で好氣的に培養しながら、該細菌をミオーイノシトールに作用させて、得られた培養液中に L-エピーイノソース-2 を生成し且つ蓄積させる工程と、その培養液から該細菌の菌体を除去して、生成された L-エピーイノソース-2 を含有する培養上清液を得る工程と、得られた培養上清液に直接に、L-エピーイノソース-2 のための還元剤として水素化ホウ素アルカリ金属、水素化トリアルコキシホウ素アルカリ金属またはシアン化水素化ホウ素アルカリ金属を添加し、該還元剤で L-エピーイノソース-2 を還元する反応を行い、これによりエピーイノシトールおよびミオーイノシトールを該培養上清液内で生成する工程と、こうして得られて、生成されたエピーイノシトールおよびミオーイノシトールを含有する培養上清液から、エピーイノシトールおよびミオーイノシトールを回収する工程と、回収されたエピーイノシトールとミオーイノシトールを相互から分離する工程とから成る、請求項 1 に記載の方

法。

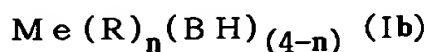
【請求項 6】 請求項 1 に記載のミオーイノシトールを L-エピーイノソース-2 へ変換できるグラム陰性細菌を、炭素源および窒素源を含有する液体培地で好氣的に培養して該細菌の培養液を取得し、さらに該培養液から該細菌の菌体を分離する工程と、こうして得た細菌菌体を水性の緩衝液または液体培地中でミオーイノシトールと反応させて L-エピーイノソース-2 を生成させる工程と、こうして得られたところの、該細菌菌体と生成された L-エピーイノソース-2 とを含有する反応液から、該細菌菌体を除去して、これにより細菌菌体を除去された L-エピーイノソース-2 含有の反応液を得る工程と、この L-エピーイノソース-2 含有の反応液に還元剤として水素化ホウ素アルカリ金属、水素化トリアルコキシホウ素アルカリ金属またはシアン化水素化ホウ素アルカリ金属を添加し、該還元剤で L-エピーイノソース-2 を還元する反応を行い、これによりエピーイノシトールおよびミオーイノシトールを生成する工程と、こうして得られた還元反応の反応液からエピーイノシトールおよびミオーイノシトールを回収する工程と、回収されたエピーイノシトールおよびミオーイノシトールを相互から分離する工程とから成る、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】 L-エピーイノソース-2 を還元する工程に用いられる還元剤は、水素化ホウ素ナトリウム、水素化ホウ素リチウム、水素化ホウ素カリウム、水素化メトキシホウ素ナトリウムまたはシアン化水素化ホウ素ナトリウムである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】 水性溶媒に L-エピーイノソース-2 を溶解し、次いでその溶液に L-エピーイノソース-2 の 1 モルあたり 0.25 モル～2 モルの割合の量で還元剤として次式 (Ia)

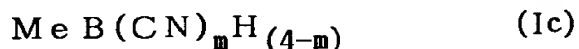


〔式中、Me はナトリウム、カリウム、リチウムであるアルカリ金属原子であり、B はホウ素原子である〕で示される水素化ホウ素アルカリ金属、もしくは次式 (Ib)



〔式中、Me はナトリウム、カリウム、リチウムであるアルカリ金属原子であり

、Rは(C₁～C₄)アルコキシ基、例えばメトキシ基、エトキシ基であり、Bはホウ素原子であり、nは1の整数である〕で示される水素化アルコキシホウ素アルカリ金属、もしくは次式(Ic)



〔式中、Meはアルカリ金属であり、Bはホウ素原子であり、mは1の整数である〕で示される水素化シアン化ホウ素アルカリ金属を添加してL-エピーイノソース-2の還元反応を行い、これにより、副成されたミオーイノシトールの生成量よりも高い生成量でエピーイノシトールを生成させることを特徴とする、エピーイノシトールの製造法。

【請求項9】 用いる水性溶媒は水であり、用いる還元剤が水素化ホウ素ナトリウムである請求項8に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

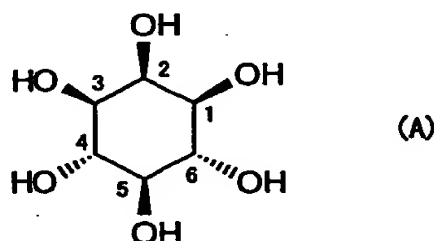
【発明の属する技術分野】

本発明は、ミオーイノシトール (myo-Inositol) から出発して、細菌の作用によりL-エピーイノソース-2 (L-epi-Inosose-2) を中間体として生成し、さらにL-エピーイノソース-2を還元してエピーイノシトール (epi-Inositol) を生成することによってエピーイノシトールを効率よく製造する方法に関する。

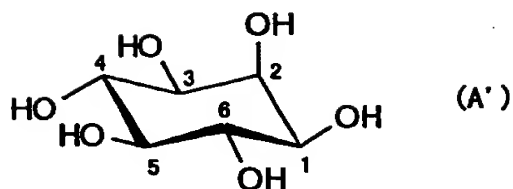
【0002】

【従来の技術】

ミオーイノシトールは次の平面式(A)



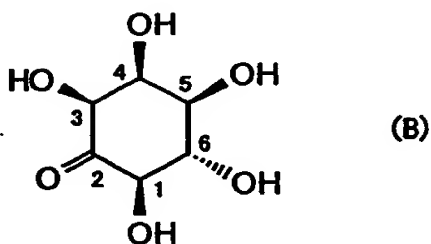
または次の立体構造式(A')



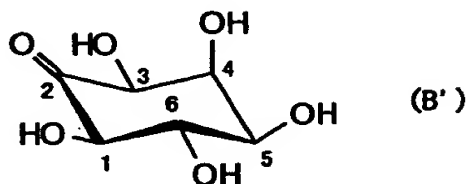
で表される天然に産する既知の物質である。

【0003】

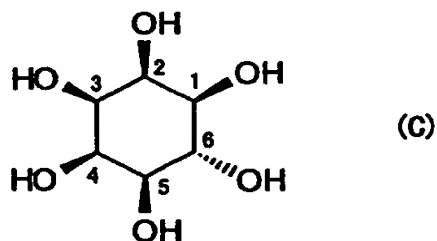
また、L-エビーイノソース-2は次の平面式 (B)



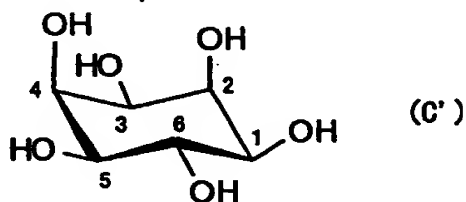
または次の立体構造式 (B')



で表される既知の物質である。さらに、エビーイノシトールは次の平面式 (C)



または次の立体構造式 (C')



で表される既知の化学合成物質である。エビーイノシトールは、ミオーイノシト

ールの立体異性体の一つである。

【0004】

イノソース (Inososes, 別名ではPentahydroxycyclohexanonesまたはAlicyclic ketohexoses)は、一般的には、イノシトールの微生物による酸化(A. J. KluyverおよびA. Boezaardt: 「Rec. Trav. Chim.」 58巻956頁(1939))、酵素による酸化法(L. Anderson et al.: 「Arch. Biochem. Biophys.」 78巻518頁(1958))、白金触媒の存在下の空気による酸化法(K. Heyns and H Paulsen: 「Chem. Ber.」 86巻、833頁(1953))、硝酸等の酸化剤による酸化法(T. Posternak: 「Helv. Chim. Acta」 19巻、1333頁(1936)) によって合成されることが知られている。

【0005】

イノシトールのうちミオーイノシトールを微生物的酸化あるいは酵素的酸化して生成するイノソースとしては、今までシロイノソース (別名: ミオーイノソース-2) が知られている (A. J. Kluyver & A. Boezaardt: 「Rec. Trav. Chim.」 58巻956頁(1939)およびL. Anderson et al.: 「Arch. Biochem. Biophys.」 78巻518頁(1958))のみである。ミオーイノシトールを酸化してL-エピーイノソース-2 (L-*epi*-Inosose-2) を生成する活性を有する微生物はこれまで報告されていない。

【0006】

イノソースのうち、L-エピーイノソース-2は、D-キロイノシトール(以下、DCIと略す)の合成原料として有用である(米国特許第5,406,005号明細書参照)。このDCIはインシュリン抵抗性糖尿病の治療剤(PCT公開W090/10439号公報)、あるいは多嚢胞性卵巣症候群の改善薬 [J. E. Nestler et al.: 「New Engl. J. Med.」 340巻、1314頁 (1999)] としての利用が期待されている。このL-エピーイノソース-2の製法としては、(1)ミオーイノシトールの硝酸による酸化で生成するラセミ体のD, L-エピーイノソース-2 ((*±*)-*epi*-Inosose) を酸化白金触媒の存在下に水素で還元してエピーイノシトールを生成し、その後に細菌のアセトバクター・サブオキシダンス (*Acetobacter suboxydans*) によるエピーイノシトールの微生物的酸化を行うことにより、L-エピーイノソース-2を合成する方法の報告がある (T. Posternak: 「Helv. Chim. Acta」 29巻、1991頁

(1946))。また、(2) D-グルクロン酸を出発原料にして化学合成したグルコジアルドースを、アシロイン縮合して生成する化合物の一つとして L-エピーイノソース-2 を合成する方法の報告がある (米国特許第 5,406,005 号)。

【0007】

イノシトールは、シクロヘキサンから誘導される 6 価アルコールの総称であり、イノシトールには 9 種の立体異性体が存在する。天然産イノシトールにはミオイノシトール、D-キローイノシトール、L-キローイノシトール、ムコーイノシトール、シローイノシトールの 5 種が見出されている。その他のイノシトールには、エピーイノシトール、アローイノシトール、ネオーイノシトール、シス-イノシトールがあり、これらは 4 種のイノシトール非天然型の化学合成されたイノシトールである。非天然型のイノシトールのうち、エピーイノシトールはうつ病、不安症の改善薬としての利用が期待されている (R. H. Belmaker らの PCT 出願 PCT/IL/00523 号の国際公開明細書 W099/22727 号および R. H. Belmaker ら: 「Int. J. Neuropsychopharmacol.」 1 巻、31~34 頁 (1998) 参照)。

【0008】

このエピーイノシトールの製法としては、1 ミオーイノシトールの硝酸による酸化で生成するラセミ体の D, L-エピーイノソース-2 ((±)-*epi*-Inosose.) を酸化白金触媒の存在下で水素で還元してエピーイノシトールを合成する方法 (T. Postemak: 「Helv. Chim. Acta」 29 巻、1991 頁 (1946) と、2 シクロヘキサジエンの 2 価アルコールをオスミウム酸で酸化してエピーイノシトールを合成する方法 (T. Tschamber ら: 「Helv. Chim. Acta」 75 巻、1052 頁 (1992) と、3 テトライドロベンゾキノンに水素添加してエピーイノシトールを合成する方法 (L. Odier: EP 特願公開 524082 公報) がある。また、4 ムコーイノシトールを適当に保護し、酸化、還元の見合わせによりエピーイノシトールを合成する方法 (K. E. Espelie ら: 「Carbohydrate Res.」 46 巻 53 頁 (1976)) もある。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、上記の従来技術による L-エピーイノソース-2 の製造方法およびエピーイノシトールの製造方法は、いずれも工業的規模で製造する方法とし

ては、反応操作の煩雑さ、環境汚染あるいは経済性の面で問題があるので、従来法はすべて必ずしも満足し得るものではない。従って、工業規模で簡便に且つ効率よくL-エピーイノソース-2を製造する方法、及びエピーイノシトールを製造する方法が要望されている。本発明の目的は、このような要望に合致して種々の利点を有するL-エピーイノソース-2およびエピーイノシトールを効率よく製造できる新しい方法を提供することにある。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記目的を達成するために鋭意検討を重ねてきた。その結果、安価に入手できるミオーイノシトールに対して、本発明者らにより土壌から新たに分離した細菌の新しい菌株であるキサントモナスsp. AB10119株を水性の媒質中で作用させると、ほぼ選択的に式(A)または(A')のミオーイノシトールの4位の水酸基のみを酸化(または脱水素)できて式(B)または(B')のL-エピーイノソース-2が生成することを見出した。このL-エピーイノソース-2を単離し、核磁気共鳴スペクトル装置、質量分析装置、旋光度計などにより機器分析を実施した結果、この物質は光学純度の高いL-エピーイノソース-2であると確認された。

【0011】

更に、ミオーイノシトールをL-エピーイノソース-2に変換できる活性を有する細菌を広く自然界から本発明者らが探索したところ、グラム陰性細菌、例えばシュードモナダセア (Pseudomonadaceae) 科のキサントモナス (Xanthomonas) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属のグラム陰性細菌、あるいはアセトバクテラセア (Acetobacteraceae) 科のアセトバクター (Acetobacter) 属、グルコノバクター (Gluconobacter) 属のグラム陰性細菌、あるいはリゾビアセア (Rhizobiaceae) 科のアグロバクテリウム (Agrobacterium) 属のグラム陰性細菌、あるいはエンテロバクテリアセア (Enterobacteriaceae) 科のエンテロバクター (Enterobacter) 属、セラチア (Serratia) 属、エルシニア (Yersinia) 属のグラム陰性細菌、あるいはパステウレアセア (Pasteurellaceae) 科のパステウレラ (Pasteurella) 属、ヘモフィルス (Haemophilus) 属のグラム陰性細菌等に属す

るところの、分類学的に広範な範囲のグラム陰性細菌において、上記のミオーイノソースを酸化してL-エピーイノソース-2へ変換できる活性または能力を有する菌株が存在することが明らかになった。

【0012】

従って先に、本発明者らは、ミオーイノシトールをL-エピーイノソース-2へ変換できる変換能を有する微生物をミオーイノシトールに作用させて、前記ミオーイノシトールをL-エピーイノソース-2へ変換させてL-エピーイノソース-2を生成することを特徴とする、L-エピーイノソース-2の新しい製造方法を提案した（1999年6月7日出願の特願平9-159861号）。

【0013】

上記したL-エピーイノソース-2の新しい製造方法は、ミオーイノシトール、ならびに通常の炭素源および窒素源を含有する液体培地、あるいは通常の炭素源を特に含有しないでミオーイノシトール（これの一部が炭素源になる）と窒素源とを含有する液体培地で上記のキサントモナスsp. AB10119株を好氣的に培養して、これにより、得られた培養液中で、ミオーイノシトールからL-エピーイノソース-2を生成させ且つこれを蓄積するようにして実施できる。

【0014】

さらに、本発明者らが別途の研究を行った結果、上記の培養液中に蓄積されたL-エピーイノソース-2は、培養液から菌体を除去した後、得られた培養上清液に直接に、適当な量の水素化ホウ素ナトリウムまたはこれと均等な水素化物の型の他の還元剤を添加して、培養上清液中でL-エピーイノソース-2に該還元剤を反応させる場合に、L-エピーイノソース-2をL-エピーイノシトールに効率よく還元できることが知見された。すなわち、培養上清液からL-エピーイノソース-2は単離されなくとも、上記の還元剤との反応により培養上清液内でL-エピーイノソース-2はエピーイノシトールに効率よく還元され得ることが見出された。

【0015】

さらに、上記のキサントモナスsp. AB10119株に代表されるところの、ミオーイノシトールをL-エピーイノソース-2に変換できる酸化能を有するグラム陰

性菌でミオーイノシトールを処理する手法、ならびに生成された L-エピーイノソース-2 を単離した後に、あるいは単離せずに、L-エピーイノソース-2 を適当な還元剤で処理してエピーイノシトールを生成し、取得する手法について、種々の実験を本発明者らは行った。その結果、多くの知見が得られて、本発明を完成するに至った。

【0016】

従って、第 1 の本発明においては、ミオーイノシトールを L-エピーイノソース-2 へ変換できる変換能を有するグラム陰性細菌を水性媒質中でミオーイノシトールに作用させて、ミオーイノシトールの L-エピーイノソース-2 への変換により L-エピーイノソース-2 を生成する工程と、前記の工程で生成された L-エピーイノソース-2 を含有する水性媒質から該細菌の菌体を除去して、得られた L-エピーイノソース-2 含有の水性媒質を取得する工程と、該水性媒質から L-エピーイノソース-2 を単離した後に、または単離せずに、L-エピーイノソース-2 を水性の溶媒中で還元剤として添加された水素化ホウ素アルカリ金属、水素化トリアルコキシホウ素アルカリ金属またはシアン化水素化ホウ素アルカリ金属で還元してエピーイノシトールおよびミオーイノシトールを生成する工程と、その還元反応の反応液から、エピーイノシトールおよびミオーイノシトールを回収する工程と、回収されたエピーイノシトールとミオーイノシトールを相互から分離する工程とを有することを特徴とするエピーイノシトールの製造方法が提供される。

【0017】

第 1 の本発明方法で使用するグラム陰性細菌は、シュードモナダセア (Pseudomonadaceae) 科のキサントモナス (Xanthomonas) 属またはシュードモナス (Pseudomonas) 属の細菌、およびアセトバクテラセア (Acetobacteraceae) 科のアセトバクター (Acetobacter) 属、グルコノバクター (Gluconobacter) 属、およびリゾビアセア (Rhizobiaceae) 科のアグロバクテリウム (Agrobacterium) 属の細菌、およびエンテロバクテリアセア (Enterobacteriaceae) 科のエンテロバクター (Enterobacter) 属、セラチア (Serratia) 属またはエルシニア (Yersinia) 属の細菌、およびパステウレアセア (Pasteurellaceae) 科のパステウレラ (Pasteur

ella) 属またはヘモフィルス (Haemophilus) 属の細菌から選ばれる細菌であることができる。

【 0 0 1 8 】

第 1 の本発明方法は、その実施態様の方法またはその変法として、下記の実施方法 (A)、(B) および (C) を包含する。

(A) ミオーイノシトールを L-エピーイノソース-2 へ変換できる変換能を有するグラム陰性細菌を、ミオーイノシトールならびに炭素源および窒素源を含有する液体培地で好氣的に培養しながら、該細菌をミオーイノシトールに作用させて、得られた培養液中に L-エピーイノソース-2 を生成し且つ蓄積させる工程と、その培養液から細菌の菌体を除去して、生成された L-エピーイノソース-2 を含有する培養上清液を得る工程と、得られた培養上清液から L-エピーイノソース-2 を単離する工程と、単離された L-エピーイノソース-2 を水性の溶媒中に溶解し、次いで還元剤として水素化ホウ素アルカリ金属、水素化トリアルコキシホウ素アルカリ金属またはシアン化水素化ホウ素アルカリ金属を添加して該水性溶媒中で L-エピーイノソース-2 を該還元剤で還元してエピーイノシトールおよびミオーイノシトールを生成する工程と、その還元反応で得られた反応液から、エピーイノシトールおよびミオーイノシトールを回収する工程と、回収されたミオーイノシトールおよびエピーイノシトールを相互から分離する工程とから成る方法。

【 0 0 1 9 】

(B) ミオーイノシトールを L-エピーイノソース-2 に変換できる変換能を有するグラム陰性細菌を、ミオーイノシトールならびに炭素源および窒素源を含有する液体培地で好氣的に培養しながら、該細菌をミオーイノシトールに作用させて、得られた培養液中に L-エピーイノソース-2 を生成し且つ蓄積させる工程と、その培養液から該細菌の菌体を除去して、生成された L-エピーイノソース-2 を含有する培養上清液を得る工程と、得られた培養上清液に直接に、L-エピーイノソース-2 のための還元剤として水素化ホウ素アルカリ金属、水素化トリアルコキシホウ素アルカリ金属またはシアン化水素化ホウ素アルカリ金属を添加し、該還元剤で L-エピーイノソース-2 を還元する反応を行い、これによ

リエピーイノシトールおよびミオーイノシトールを該培養上清液内で生成する工程と、こうして得られたところの、生成されたエピーイノシトールおよびミオーイノシトールを含有する培養上清液から、エピーイノシトールおよびミオーイノシトールを回収する工程と、回収されたエピーイノシトールとミオーイノシトールを相互から分離する工程とから成る方法。

【0020】

(C) ミオーイノシトールをL-エピーイノソース-2へ変換できる変換能を有するグラム陰性細菌を、炭素源および窒素源を含有する液体培地で好氣的に培養して該細菌の培養液を取得し、さらに該培養液から該細菌の菌体を分離する工程と、こうして得た細菌菌体を水性の緩衝液または液体培地中でミオーイノシトールと反応させてL-エピーイノソース-2を生成させる工程と、こうして得られたところの該細菌菌体と生成されたL-エピーイノソース-2とを含有する反応液から、該細菌菌体を除去して、これにより細菌菌体を除去されたL-エピーイノソース-2含有の反応液を得る工程と、このL-エピーイノソース-2含有の反応液に還元剤として水素化ホウ素アルカリ金属、水素化トリアルコキシホウ素アルカリ金属またはシアン化水素化ホウ素アルカリ金属を添加し、該還元剤でL-エピーイノソース-2を還元する反応を行い、これによりエピーイノシトールおよびミオーイノシトールを生成する工程と、こうして得られた還元反応の反応液からエピーイノシトールおよびミオーイノシトールを回収する工程と、回収されたエピーイノシトールおよびミオーイノシトールを相互から分離する工程とから成る方法。

【0021】

以下に、第1の本発明方法の実施を具体的に説明する。

第1の本発明方法において使用するグラム陰性細菌は、ミオーイノシトールをL-エピーイノソース-2に変換する能力を有するグラム陰性細菌であればいずれの菌株でもよい。

具体的に例示すると、前述したようにミオーイノシトールからのL-エピーイノソース-2生産菌は多種存在するが、例えば本発明者らが分離したキサントモナス・エスピーAB10119株は本発明方法で最も有効に使用される菌株の一例であ

る。本菌株の菌学的性質を示すと下記の通りである。

【 0 0 2 2 】

尚、本菌株の同定の当たっては、新細菌培地学講座（第 2 版、近代出版）、医学細菌同定の手引き（第 2 版、近代出版）、細菌学実習提要（丸善）に準じて実験を行い、実験結果を Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.1 (1984) を参考にして同定した。

【 0 0 2 3 】

キサントモナス・エスピー AB10119 株の菌学的性質を下記に示す。

(a) 形態的特徴

(1) 細胞形態：桿菌で大きさは $0.5 \sim 0.7 \times 1.5 \sim 3.5 \mu\text{m}$ 。多形性は無い。

【 0 0 2 4 】

(2) 運動性：懸滴法及び SIM 培地での本菌の観察の結果では運動性は認められなかった。

(3) 普通寒天培地上での生育状態：生育は中程度。コロニー形態は円形、平滑で光沢を帯びる。色調は黄土色～黄色である。

【 0 0 2 5 】

(b) 生理生化学的性状

(1) グラム染色：	—
(2) OF テスト：	0
(3) 好気条件での生育：	+
(4) 嫌気条件での生育：	—
(5) 生育温度：	
8℃	—
13℃	±
17℃	+
21℃	+
37℃	+
42℃	±
47℃	—

(6)食塩耐性：

0%	+
2%	+
5%	-

(7)生育pH：

pH4	-
pH5	±
pH6	+
pH9	+
pH10	-

【0026】

(8)色素の産生：

マンニット酵母エキス寒天培地（不溶性色素の検出用）では、菌体が薄い黄土色～黄色に着色した。

King培地B（水溶性色素の検出用）では、寒天中に薄い黄色の色素を産生した。

【0027】

(9)チトクロームオキシダーゼの産生：	-
(10)カタラーゼの産生：	+
(11)硝酸塩還元性：	-
(12)硫化水素の産生：	-
(13)アセトイン産生：	-
(14)ゼラチンの液化：	+
(15)Tween 80 の分解：	+
(16)インドールの産生：	-
(17)マロン酸の利用性：	-
(18)ONPG の分解性：	+
(19)エスクリンの分解性：	+
(20)デオキシリボヌクレアーゼ活性：	-

(21) クエン酸の利用性：＋

【 0 0 2 8 】

(22) アミノ酸に対するデカルボキシラーゼ活性：

L-リジン－

L-アルギニン－

L-オルニチン－

(23) 尿素分解性：－

(24) アセトアミド分解性：－

(25) リトマスミルク：凝固せず。赤色に変化。

【 0 0 2 9 】

(26) 澱粉の分解：－

(27) 色素および薬剤感受性試験：

0.01%メチルグリーン＋(感受性のために、生育しない)

0.01%チオニン－

0.01%酢酸鉛－

【 0 0 3 0 】

(28) 各種糖類からの酸の生成：

グルコース＋

キシロース－

マンノース＋

アラビノース＋

フルクトース＋

マルトース＋

ラムノース－

マンニトール－

シュークロース－

アドニトール－

ミオ-イノシトール－

ソルビトール－

ガラクトース	+
トレハロース	-
セロビオース	+
イヌリン	-
ズルシトール	-
サリシン	+
ラクトース	-
グリセロール	-
ラフィノース	-
α -メチル-グルコース	-

【0 0 3 1】

(29)炭素源の資化性：

グルコース	+
セロビオース	+
β -ヒドロキシブチレート	-
L-ヒシチジン	+
パントテン酸	-
マルトース	+
ラクトース	-
トレハロース	+
サリシン	-
アスパラギン	-
メチオニン	-
ミオーイノシトール	-

【0 0 3 2】

以上の通り、AB10119株はその主性状からコロニーが黄色の色素を帯びるグラム陰性の桿菌であると認められる。本菌株の細胞の大きさは $0.5 \sim 0.7 \times 1.5 \sim 3.5 \mu\text{m}$ であって、グルコースを好氣的に分解し、酸を生成する。カタラーゼの産生は陽性、オキシダーゼの産生は陰性である。本菌株は0.01%のメチルグリーンに

感受性であった。

【 0 0 3 3 】

これらの菌学的性質を総合して、本菌株はキサントモナス (*Xanthomonas*) 属に属する菌株であると判断した。Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.1(1984)199頁～210頁によると、キサントモナス属細菌には、5種のスピーズ (キサントモナス・カンペストリス；キサントモナス・フラガリアエ；キサントモナス・アルブリネンス；キサントモナス・アキソノポディス；キサントモナス・アメリザ) が知られている。AB10119株の菌学的性状を上記の既知のスピーズ種と比較検討した結果、AB10119株はキサントモナス・カンペストリスに最も近縁の種であると考えられた。しかし本菌株はキサントモナス・カンペストリスに完全には一致しなかったので、本AB10119株を公知のものと区別するため、キサントモナス・エスピー AB10119株と命名し、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-17382として寄託した (寄託日は平成1999年 5 月 7 日)。

【 0 0 3 4 】

第 1 の本発明方法においては、最初に、使用グラム陰性菌を水性媒質中でミオーイノシトールに作用させて L-エピーイノソース-2 を生成する工程を行う。この工程で用いる水性媒質は、使用される細菌がその中で生存できる水性の液体媒質であればよい。かかる水性媒質としては、水、あるいは細菌を培養するのに一般に常用される液体の栄養培地、あるいは各種の緩衝液、例えばリン酸緩衝液、トリス緩衝液またはその他の適当な緩衝液が使用できる。

【 0 0 3 5 】

第 1 の本発明方法の上記の最初の工程において、使用細菌をミオーイノシトールに作用させる温度は 5℃～40℃の範囲であることができる。使用細菌をミオーイノシトールに作用させる時間は、回収するのに足る十分量の L-エピーイノソース-2 が水性媒質内で生成されて蓄積されるまでに要する時間であり、一般的には 3 日間～10日間の範囲である。

【 0 0 3 6 】

なお、第 1 の本発明方法では、その最初の工程は、使用細菌を液体培地中で培養しながら、培養中の細菌と、培地に当初からまたは培養過程の中間時に混合さ

れたミオーイノシトールとの間で反応を行うようにする手法でも実施できる。この手法で行う場合の本発明方法の実施法が前述した実施方法 (B) である。また、第 1 の本発明の方法の最初の工程は、使用細菌を適当な培地中で培養し、増殖した細菌の菌体を得られた培養液から分離し、分離された細菌菌体を適当な水性媒質に混合し、さらにそのように得られた混合物にミオーイノシトールを添加および溶解し、あるいは分離された細菌菌体をミオーイノシトールを含有する水性媒質に混合してさらに細菌菌体とミオーイノシトールとの反応を該水性媒質中で行うようにする手法でも実施できる。この手法で行う場合の本発明方法の実施法が前述した実施方法 (C) である。

【 0 0 3 7 】

第 1 の本発明方法では、その最初の工程により、ミオーイノシトールから生成された L-エピーイノソース-2 を溶解、含有し且つ細菌菌体を含有する水性媒質 (反応液) が得られる。本方法の最初の工程で得られたところの、細菌菌体および生成した L-エピーイノソース-2 を含有した水性媒質から、本発明方法の第 2 工程において細菌菌体を除去する。この細菌菌体の除去工程は、第 1 工程から得た L-エピーイノソース-2 および菌体含有の水性媒質を、遠心分離または微細をもつ濾過膜での濾過法にかけることによって水性媒質から細菌菌体を分離するようにして実施できる。

【 0 0 3 8 】

本発明方法の上記の第 2 工程によって、細菌菌体を除去されたが生成 L-エピーイノソース-2 を含有する水性媒質が得られる。この水性媒質は、本発明方法の第 2 工程の後に、これから L-エピーイノソース-2 を単離するように処理できる。この L-エピーイノソース-2 の単離工程は、上記の第 2 工程で得られた細菌菌体を含まないが L-エピーイノソース-2 を含有する水性媒質を次の処理法、すなわち該水性媒質を、活性炭カラムに通して L-エピーイノソース-2 以外の成分の大部分を活性炭に吸着させ、活性炭カラムから流出した通過液を、L-エピーイノソース-2 およびその他の成分の少量を含有する水溶液として採取し、該通過液を強酸性陽イオン交換樹脂カラムに通し、該カラムから流出した通過液を次いで強塩基性イオン交換樹脂カラムに通し、後者カラムから流出した通

過液をＬ－エピーイノソース－２を主成分として含む水溶液として回収し、該水溶液を濃縮し、得られた濃縮液にエタノールを混合してＬ－エピーイノソース－２を沈殿または結晶として析出させることから成る処理法にかけることによって達成できる。

【 0 0 3 9 】

このように単離されたＬ－エピーイノソース－２は、本発明方法の第３工程において、水性溶媒、例えば水、あるいは含水有機溶媒例えば含水のジメチルスルホキシド（DMSO）、含水のジメチルホルムアミド（DMF）に溶解され、さらに得られた溶液に還元剤として水素化ホウ素アルカリ金属または他の水素化物を添加し、その溶液中でＬ－エピーイノソース－２を該還元剤で還元してエピーイノシトールおよびミオーイノシトールを生成する手法で処理される。このような手法で本発明方法の第３工程を実施する事例が第１の本発明方法の前述した実施方法（Ａ）である。

【 0 0 4 0 】

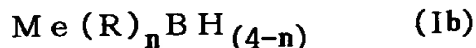
他方、第１の本発明方法の第２工程で得られたところの、細菌菌体を含有しないでＬ－エピーイノソース－２を溶解、含有する水性媒質から、Ｌ－エピーイノソース－２を上記のように単離することは必ずしも必要でない。Ｌ－エピーイノソース－２の単離を行わない場合には、第２工程で得られた前記の水性媒質に直接に、還元剤として水素化ホウ素アルカリ金属またはその他の水素化物を添加してＬ－エピーイノソース－２の還元反応を行う。第１の本発明方法の第１工程で使用グラム陰性細菌を、ミオーイノシトールを含有する液体培地中で培養しながら該細菌をミオーイノシトールに作用させて、得られた培養液中にＬ－エピーイノソース－２を生成し蓄積させ、この得られた培養液から細菌菌体を除去してＬ－エピーイノソース－２を含有する培養上清液を収得し、さらに培養上清液に直接に水素化ホウ素アルカリ金属またはその他の水素化物を還元剤として添加し、次いで培養上清液中でＬ－エピーイノソース－２の還元反応を行うようにする手法で第１の本発明方法を実施する事例が、第１の本発明方法の前述した実施方法（Ｂ）に属する。

【 0 0 4 1 】

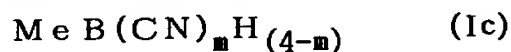
第 1 の本発明方法の第 3 工程では、前記したように、Ｌ－エピーイノソースー 2 を水素化ホウ素アルカリ金属またはその他の水素化物で還元する反応が行われる。この還元反応で還元剤として用いられる水素化物は、次式 (Ia)



〔式中、Me はナトリウム、カリウム、リチウムであるアルカリ金属原子であり、B はホウ素原子である〕で示される水素化ホウ素アルカリ金属、もしくは次式 (Ib)



〔式中、Me はナトリウム、カリウム、リチウムであるアルカリ金属原子であり、R は (C₁～C₄) アルコキシ基、例えばメトキシ基、エトキシ基であり、B はホウ素原子であり、n は 1 の整数である〕で示される水素化アルコキシホウ素アルカリ金属、もしくは次式 (Ic)



〔式中、Me はアルカリ金属原子であり、B はホウ素原子であり、m は 1 の整数である〕で示される水素化シアン化ホウ素アルカリ金属であることができる。

【 0 0 4 2 】

この還元反応工程では、還元すべきＬ－エピーイノソースー 2 の 1 モルあたりに 0.25 モル～2 モルの割合で添加された式 (Ia)、(Ib) または (Ic) の水素化物によりＬ－エピーイノソースー 2 を還元する。還元剤として好ましい水素化物は、水素化ホウ素ナトリウム、水素化ホウ素リチウム、水素化ホウ素カリウム、水素化トリメトキシホウ素ナトリウム、シアン化水素化ホウ素ナトリウムである。還元反応時間は、存在するＬ－エピーイノソースー 2 の全量または実質的に全量をエピーイノシトールおよびミオーイノシトールに還元するのに要する時間であるのが好ましい。しかしながら、Ｌ－エピーイノソースー 2 の消失した時点または反応生成物の量が適当な量に達した時点を経験の終了点の目安とすることができる。

【 0 0 4 3 】

第 1 の本発明方法の第 3 工程で前述したようにＬ－エピーイノソースー 2 の還元反応を終了した後には、第 3 工程で得られた還元反応の反応液から、生成された

エピーイノシトールおよびミオーイノシトールを回収する本法の第4工程を行う。L-エピーイノソース-2を含有する培養上清液に還元剤としての水素化物を添加して還元反応を行った場合の得られた還元反応の反応液からのエピーイノシトールおよびミオーイノシトールの回収は、次の手法で行うことができる。すなわち、還元反応を終了した後の培養上清液を、不望成分の除去の目的で強酸性陽イオン交換樹脂、例えばデュオライト(登録商標)C-20(H^+ 型)を充填したカラムに通過させ通過液を集め、その後このカラムに脱イオン水を通過させ洗浄して洗浄液を集め、得られた通過液及び洗浄液を合併して強塩基性陰イオン交換樹脂、例えばデュオライト(登録商標)A-113(OH^- 型)を充填したカラムに通過させ、その通過液を集め、その後このカラムに脱イオン水を通過させて洗浄してその洗浄液を集め、そしてこうして得られた通過液及び洗浄液を合併し、エピーイノシトールとミオーイノシトールを含み且つそれら以外の不純物はほとんど含有しない水溶液を取得する。このようにして、エピーイノシトールとミオーイノシトールがその水溶液として回収できる。

【 0 0 4 4 】

第1の本発明方法の最終(第5)工程では、先の第4工程で回収されたエピーイノシトールおよびミオーイノシトールの水溶液からエピーイノシトールとミオーイノシトールを別々に分離する。このためには、前記の両イノシトールの水溶液を減圧下で濃縮し、その濃縮液を強塩基性陰イオン交換樹脂、例えばアンバーライト(登録商標)CG-400(OH^- 型)を充填したカラムに通過させ、その後このカラムに脱イオン水を通過させて該カラムから溶出し、副生成物のミオーイノシトールを主として含有する溶出液画分と、目的のエピーイノシトールを含有する溶出液画分とを別々に得る。このエピーイノシトールを含む水溶液を得る。この水溶液を濃縮して得られたエピーイノシトールの濃厚溶液に、エタノールの適当量を加え、室温または低温で一晩放置すると、純粋なエピーイノシトールの結晶を晶出できる。

【 0 0 4 5 】

なお、上記の還元終了後の培養上清液を複数のイオン交換樹脂カラムで処理する第4工程では、エピーイノシトールおよびミオーイノシトールを含有するがそ

の他の不純成分をほとんど含有しない水溶液が得られる。この水溶液を濃縮し、得られた濃縮液を、スルホン酸基を交換基とするスチレン窒素重合体よりなる強酸性陽イオン交換樹脂(Ca^{2+} 型)、例えばダイヤイオンUBK520M(登録商標、三菱化学社製)(Ca^{2+} 型)のカラムに通して、カラムにエピーイノシトールおよびミオーイノシトールを吸着させ、次いでカラムを脱イオン水で溶出する方法によって、ミオーイノシトールからエピーイノシトールを効率よく分離できることが本発明者らにより見出されている。

【 0 0 4 6 】

さらに、前述したように、第1の本発明方法の第1工程および第2工程を行うことにより、生成したL-エピーイノソース-2を含有する水性媒質を取得することができる。さらに、ここで得た該水性媒質からL-エピーイノソース-2を前記の処理法により単離することもできる。単離されたL-エピーイノソース-2を水性の溶媒に溶解し、得られたL-エピーイノソース-2溶液に還元剤として水素化物を添加し、次いでL-エピーイノソース-2を還元する場合には、目的のエピーイノシトール、ならびに副成のミオーイノシトールおよび還元剤の分解生成物を含む還元反応液が得られる。ここで得られた還元反応液を、次いで強酸性陽イオン交換樹脂カラムに通し、さらにその通過液を強塩基性陰イオン交換樹脂カラムに通すことからなる後処理法にかけることにより、エピーイノシトールおよびミオーイノシトールを専ら含有する水溶液が回収できる。このように回収されたエピーイノシトールとミオーイノシトールとの水溶液を濃縮し、その濃縮液を強塩基性陰イオン交換樹脂あるいは強酸性陽イオン交換樹脂による前記のクロマトグラフィー方法にかけると、エピーイノシトールおよびミオーイノシトールを別々に単離できる。

【 0 0 4 7 】

次に、第1の本発明方法の前記した実施方法(A)を更に具体的に説明する。

実施方法(A)では、液体栄養培地に、ミオーイノシトールをL-エピーイノソース-2へ変換できる変換能を有するグラム陰性細菌を接種して好氣的に培養することにより、培養液内でL-エピーイノソース-2を生成して培養液中に蓄積させる工程を先づ行う。

【0048】

用いる液体培地の組成は、目的に合致する限り何ら特別の制限がなく、ミオーイノシトール以外に通常の炭素源、窒素源を含有するものであり、これらに加えて有機質の栄養源および無機塩類等を配合できる。前記の液体培地として合成培地または天然培地のいずれも使用できる。原料として、ミオーイノシトールを0.1%~35%、より好ましくは15~25%を液体培地に添加するのが好ましい。

【0049】

炭素源としては、グルコース、スクロース、デキストリン、澱粉あるいはグリセロール等を0.01%から30%、好ましくは0.5%から10%の量で使用培地に添加するのが望ましい。窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウムあるいは尿素等を0.01%~1.0%、好ましくは0.05%~0.5%の量で添加するのが望ましい。また、有機質の栄養源として、酵母エキス、ペプトン、カザミノ酸等を適当量(0.05%から5%)で使用培地に添加するのが望ましい。

【0050】

その他必要に応じ、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、ゴバルト、マンガン、亜鉛、鉄、銅、モリブデン、リン酸、硫酸などのイオンを生成することができる無機塩類を培地中に添加することが有益である。培養液中の水素イオン濃度をpH4~10、好ましくはpH5~9に調整して使用微生物を培養すると、ミオーイノシトールから効率よくL-エピーイノソース-2を生成できる。

【0051】

細菌の培養条件は、使用菌株や培地の種類によっても異なるが、培養温度は5~40℃、好ましくは20~37℃であり、培養時間は1~14日、好ましくは3~10日である。また、培養は液体培地を振とうしたり、液体培地中に空気を吹き込むなどして好氣的に行えば良い。

【0052】

得られた培養液から細菌菌体を遠心分離または別の手段により除去する工程を次に行う。得られた培養上清液から目的のL-エピーイノソース-2を単離する方法は、通常の水溶性の中性物質を単離して精製する一般的な方法を応用することができる。すなわち、培養上清液を活性炭や、イオン交換樹脂等のカラムを通

過させて処理することにより、L-エピーイノソース-2以外の不純物をほとんど除かれたL-エピーイノソース-2を含有する水溶液をカラムから得ることができる。その後、該水溶液を濃縮乾固し、得られたL-エピーイノソース-2粉末を再結晶することにより、L-エピーイノソース-2の純品を単離することができる。

【0053】

その後、このように単離されたL-エピーイノソース-2を、水素化ホウ素アルカリ金属またはその他の水素化物よりなる還元剤で還元する工程、ならびにこうして得られた還元反応液から生成されたエピーイノシトールを取得する次後の諸工程は、先に説明した手法のとおりを実施できる。

【0054】

次に、第1の本発明方法の前記した実施方法(B)について具体的に説明する。

【0055】

実施方法(B)において、使用されるグラム陰性細菌をミオーイノシトール含有の液体培地で培養しながら培養液中にL-エピーイノソース-2を生成、蓄積させる工程、および培養液から細菌菌体を除去してL-エピーイノソース-2含有の培養上清液を得る工程は、前記した実施方法(A)におけると全く同様に行えうる。実施方法(B)の第3工程では、第2工程で得られた培養上清液に直接に還元剤としての水素化物を添加して還元反応を行う。これによって、培養上清液内でL-エピーイノソース-2からエピーイノシトールおよびミオーイノシトールが生成される。

【0056】

使用される還元剤は、水系中でL-エピーイノソース-2をエピーイノシトールに還元できる還元剤として、例えば水素化ホウ素ナトリウム、水素化ホウ素リチウム、水素化ホウ素カリウム、水素化トリメトキシホウ素ナトリウム、シアン化水素化ホウ素ナトリウムであるのが好ましい。還元反応は0℃～室温の温度で行う。L-エピーイノソース-2の消失した時点または反応生成物の生成量が適当になった時点で反応を終了する。これによって、生成されたエピーイノシトールおよびミオーイノシトールを含有する培養上清液が還元反応の反応液として得

られる。

【 0 0 5 7 】

ここで得られた還元反応の反応液(培養上清液)からエピーイノシトールおよびミオーイノシトールを回収する第4の工程を次に行う。この第4工程では、第1の本発明方法の実施について先に説明したとおり、該培養上清液を強酸性陽イオン交換樹脂のカラムに通し、該カラムからの通過液を強塩基性陰イオン交換樹脂のカラムに通す。これによって、エピーイノシトールおよびミオーイノシトールを含有するがその他の不純物成分をほとんど含有しない水溶液が収得できる。さらに、実施方法(B)の最終工程では、先の第4工程で得られたエピーイノシトールとミオーイノシトールの水溶液から、先に説明したクロマトグラフィー的手法により、目的のエピーイノシトールをミオーイノシトールと別個に単離する。得られたエピーイノシトールは、必要に応じて再結晶により更に精製できる。

【 0 0 5 8 】

次に、第1の本発明方法の前記した実施方法(C)について具体的に説明する。

この実施方法(C)の第1工程では、使用されるグラム陰性細菌を、細菌の培養に常用される液体培地で好氣的に培養し、得られた培養液から該細菌の菌体を分離する。このように分離された菌体を実施方法(C)の第2工程で使用する。

【 0 0 5 9 】

菌体としては、実施方法(A)により得た培養液から菌体を分離して集めた菌体を用いてもよい。また、前記の使用グラム陰性細菌を別途に適当な培養条件で培養して得た菌体を用いてもよい。菌体の分離と集菌は、培養液から遠心分離、濾過等の公知の手段により行えばよい。

実施方法(C)の第2工程において、菌体をミオーイノシトールに反応させる液体反応媒質としては、緩衝液または液体培地が用いられる。液体培地としては、実施方法(A)におけるものと同様のものを用いてもよい。緩衝液としては、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、グッド(Good's)のCHES緩衝液等を10~500mM、好ましくは20~100mMの濃度で用いればよい。ここで用いた反応媒質にとかしたミオーイノシトールの濃度は0.1~30%(重量)の程度とするのが好ましい。

【 0 0 6 0 】

菌体とミオーイノシトールとの反応条件は、使用菌株や使用された反応媒質の緩衝液または液体培地の種類によって異なる。反応温度は5～60℃、好ましくは10～45℃であり、反応時間は1～50時間、好ましくは3～48時間である。反応媒質として用いられる緩衝液または液体培地のpHは2～10、好ましくは3～9である。

【0061】

該第2工程で細菌菌体をミオーイノシトールと反応させると、細菌菌体とL-エピーイノソース-2とを含有する反応液が得られる。次の第3工程では、該反応液から菌体を遠心分離または濾過法により除去する。これにより、細菌菌体を除去されてL-エピーイノソース-2を含有する残りの反応液が得られる。

【0062】

実施方法(C)の第4工程では、先の第3工程で得られた菌体を除かれたL-エピーイノソース-2含有の反応液に還元剤としての水素化物を添加して、L-エピーイノソース-2の還元反応を行い、これによりエピーイノシトールおよびミオーイノシトールを生成する。この還元反応は、第1の本発明方法の実施について先に説明したと同じ要領で行いうる。

実施方法(C)の第4工程に次いで、ここで得られたエピーイノシトールおよびミオーイノシトールを含有する還元反応液から、所望のエピーイノシトールを取得する次後の諸工程を行う。これら次後の諸工程は、先に第1の本発明方法について説明した手法と同様に実施できる。

【0063】

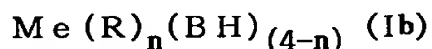
さらに本発明者らは、別段の研究を行った。すなわち、L-エピーイノソース-2を水性溶媒、特に水中で各種の還元剤で還元してエピーイノシトールを生成するのに適当な方法を研究した。その結果、L-エピーイノソース-2を適当な濃度で水性溶媒にとかし、その溶液にL-エピーイノソース-2の1モルあたり0.25モル～2モルの割合の量でアルカリ金属水素化物型の還元剤を添加して還元反応を行う場合には、生成された所望のエピーイノシトールの生成量が副成されたミオーイノシトールの量よりも増加できることが知見された。

【0064】

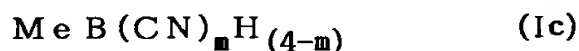
従って、第2の本発明においては、水性溶媒にL-エピーイノソース-2を溶解し、次いでその溶液にL-エピーイノソース-2の1モルあたり0.25モルの割合の量で還元剤として次式 (Ia)



〔式中、Me はナトリウム、カリウム、リチウムであるアルカリ金属原子であり、B はホウ素原子である〕で示される水素化ホウ素アルカリ金属、もしくは次式 (Ib)



〔式中、Me はナトリウム、カリウム、リチウムであるアルカリ金属原子であり、R は(C₁~C₄)アルコキシ基、例えばメトキシ基、エトキシ基であり、B はホウ素原子であり、n は1の整数である〕で示される水素化アルコキシホウ素アルカリ金属、もしくは次式 (Ic)



〔式中、Me はアルカリ金属であり、B はホウ素原子であり、m は1の整数である〕で示される水素化シアン化ホウ素アルカリ金属を添加してL-エピーイノソース-2の還元反応を行い、これにより、副成されたミオーイノシトールの生成量よりも高い生成量でエピーイノシトールを生成させることを特徴とする、エピーイノシトールの製造法が提供される。

【0065】

第2の本発明方法で用いられる水性の溶媒は水、または含水DMSOまたは含水DMFであるのが好ましく、還元剤は水素化ホウ素ナトリウムであるのが好ましい。この還元反応は0~50℃の温度、好ましくは0℃~室温の温度で行いうる。

【0066】

【発明の効果】

本発明方法によれば、医薬として有用な純度の高いエピーイノシトールを効率よく且つ安価に製造することができる。

【0067】

【発明の実施の形態】

以下に、本発明方法をその実施例について説明する。

実施例1

実施方法(A)によるエビーイノシトールの製造例

(1) L-エビーイノソース-2の生成

ミオーイノシトール 12.0%(360g)、酵母エキス 1.2%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%、 K_2HPO_4 0.7%、 KH_2PO_4 0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%を含むpH7の液体培地3リットルを、100mlずつ500ml容のバッフル付き三角フラスコに分注し、オートクレーブ滅菌した。各々の三角フラスコにキサントモナス・エスピーAB10119株(FERM P-17382)を接種し、27℃で3日間振とう培養した。培養液を遠心分離(8,000rpm、20分間)して菌体を除去し、得られた上清を培養上清液とした。この培養上清液を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により下記の条件で分析した。その結果、培養上清液中にはL-エビーイノソース-2が66mg/mlの濃度で生成していることがわかった(ミオーイノシトールからL-エビーイノソース-2の反応収率55.6%)。

【0068】

高速液体クロマトグラフィーの分析条件は以下の通りである。

カラム: Wakosil 5NH₄ : 4.6×250mm

カラム温度 : 40℃

検出器 : RI DETECTOR ERC-7515A (ERMA CR. INC.)

注入量 : 20μl

溶媒 : アセトニトリル-水=4:1

溶出時間 : L-エビーイノソース-2 ; 6.7分

なお、上記のL-エビーイノソース-2の反応収率は、次式により求めた。

反応収率(%) = [培養上清液中のL-エビーイノソース-2のモル数 ÷ 培養開始前の培地中のミオーイノシトールのモル数] × 100

【0069】

(2) L-エビーイノソース-2の単離と精製

上記で得た培養上清液の3リットルを活性炭300mlを充填したカラム(内径5cm、長さ30cm)に通過させて通過液を集めた。その後にこのカラムに600mlの脱イオン水を通過させ洗浄した。このカラム通過液及び洗浄液を合併してその混合物を、強酸性陽イオン交換樹脂デュオライト(登録商標)C-20(H⁺型)300mlを充填したカ

ラム(内径5cm、長さ30cm)に通過させてその通過液を集めた。その後このラムに300mlの脱イオン水を通して洗浄液を集めた。このラムの通過液及び洗浄液を合併して、その混合物を強塩基性陰イオン交換樹脂デュオライト(登録商標侯A-113(OH⁻型)100mlを充填したラム(内径5cm、長さ30cm)に通過させて、その通過液を集めた。その後このラムに300mlの脱イオン水を通して洗浄して洗浄液を集めた。

【 0 0 7 0 】

こうして得られた通過液と水洗浄液とを合併した。得られた水溶液中にはL-エピーイノソース-2が含有され、それ以外の不純物はほとんど存在していなかった。

上記により得た合併水溶液を減圧下で200mlまで濃縮し、その濃縮液にエタノールを5倍量加え5℃で一晩放置したところ、ほぼ純粋なL-エピーイノソース-2の結晶128gを得た。

【 0 0 7 1 】

この結晶を100mlの蒸留水に溶解させ、5倍容量のエタノールを加え、5℃で一晩再結晶した結果、純粋なL-エピーイノソース-2の無色結晶を100g(回収率55.5%)得た。

なお、L-エピーイノソース-2の上記の回収率は次式により求めた。

回収率(%) = [結晶として単離したL-エピーイノソース-2の量 ÷ 培養上清液3L中に含有された単離前のL-エピーイノソース-2量] × 100

【 0 0 7 2 】

(3) エピーイノシトールの生成と単離

実施例1、(2)で得たL-エピーイノソース-2の結晶50gを250mlの水に溶かし、その溶液に水素化ホウ素ナトリウム3.2gを徐々に加えた。反応温度を5℃以下に調整しながらL-エピーイノソース-2の還元を行った。還元終了後、得られた反応液を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により分析した。その結果、反応液中には、エピーイノシトールが29.6g生成され、また副生成物としてミオーイノシトールが10.9g生成していることがわかった(エピーイノシトールとミオーイノシトールの合計収率81.0%)。L-エピーイノソース-2からのエピーイノシト

ールの収率は55.4%であった。

【0073】

なお、上記のエピーイノシトールとミオーイノシトールの合計収率は、次の計算式により求めた。

エピーイノシトールとミオーイノシトールの合計収率(%) = [還元反応後の反応液中のエピーイノシトールのモル数とミオーイノシトールのモル数の合計 ÷ 還元反応前の反応混合物中のL-エピーイノソース-2のモル数] × 100

また、上記のL-エピーイノソース-2からのエピーイノシトールの収率は次の計算式により求めた。

エピーイノシトールの収率(%) = [反応後の反応液中のエピーイノシトールのモル数 ÷ 還元反応前の反応混合物中のL-エピーイノソース-2のモル数] × 100

【0074】

還元反応後の反応液中からのエピーイノシトールの単離と精製は後記の実施例4、(4)に示したイオン交換樹脂カラムを用いるクロマトグラフィー的手法により行った。その結果、エピーイノシトールの結晶を17.8g得た。この時のエピーイノシトールの回収率は60.1%であった。

回収率(%) = [結晶として単離したエピーイノシトールの重量 ÷ 還元反応後の反応液に含有されたエピーイノシトールの重量] × 100

【0075】

実施例2

実施方法(A)によるエピーイノシトールの製造の第2例

(1) 種培養物の調製

ミオーイノシトール 2.0%、酵母エキス 0.2%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%、 K_2HPO_4 0.7%、 KH_2PO_4 0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%を含むpH7の液体培地100mlを500ml容のバツフル付き三角フラスコに分注し、オートクレーブ滅菌した。各々の三角フラスコにキサントモナス・エスピーAB10119株を接種し、27℃で1日間振とう培養した。得られた培養液を種培養物とした。

【0076】

(2) ジャーファーマンターでの L-エピーイノソース-2 の製造と単離

ミオーイノシトール 12.0%、酵母エキス 1.2%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%、 K_2HPO_4 0.7%、 KH_2PO_4 0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%を含む pH7 の液体培地 2.5 リットルを、4L (リットル) 容のジャーファーマンターに分注し、オートクレーブ滅菌した。このジャーファーマンターにキサントモナス・エスピー AB10119 株の、上記(1)の方法で調製した種培養物 25ml を接種した。この後、培養温度は 27℃、通気量は 1vvm、回転数は 200rpm で培養を実施した。培養は 3 日間行い、培養期間中の pH を 5M NaOH 水溶液及び 3M HCl 水溶液の添加で $\text{pH}7 \pm 0.2$ に自動調整した。3 日間培養後の培養液を遠心分離 (8,000rpm、20 分間) して菌体を除去した。得られた上清を培養上清液とした。

この培養上清液を高速液体クロマトグラフィーにより前記の実施例 1、(1) と同様の条件で分析した。その結果、培養上清液中には L-エピーイノソース-2 が 60mg/ml の濃度 (L-エピーイノソース-2 の反応収率 50.5%) で生成していることがわかった。

【 0 0 7 7 】

培養上清液 2.5 リットルからの L-エピーイノソース-2 の単離は、実施例 1 (2) に記載した方法に準じて行って、L-エピーイノソース-2 の結晶として 114g (回収収率 76%) を得た。なお、上記 L-エピーイノソース-2 の回収収率は、上記実施例 1 に準じて次式により求めた。

回収収率 (%) = [結晶として単離した L-エピーイノソース-2 量 ÷ 培養上清液 2.5L 中に含有された単離前の L-エピーイノソース-2 の量] × 100

【 0 0 7 8 】

(3) エピーイノシトールとミオーイノシトールの生成

上記(2)項で得られた L-エピーイノソース-2 の結晶の 50g を、実施例 1 (3) と同様に水 250ml に溶解し、得られた水溶液に水素化ホウ素ナトリウムの 3.0g を加えた。5℃ 以下に反応温度を維持しながら L-エピーイノソース-2 の還元反応を行った。得られた反応液を HPLC で分析すると、エピーイノシトールおよびミオーイノシトールの生成が確認された。

【 0 0 7 9 】

実施例3

実施方法(C)によるエピーイノシトールの製造例

(1) 菌体の生産

ミオーイノシトール 0.5%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%、 K_2HPO_4 0.7%、 KH_2PO_4 0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%を含むpH7の液体培地2Lを500ml容のバッフル付き三角フラスコに100mlずつ分注し、オートクレーブ滅菌した。各々の三角フラスコにキサントモナス・エスピーAB10119株を接種し、27℃で3日間振とう培養した。この培養液を遠心分離して、得られた菌体を、0.05M リン酸緩衝液(pH7.0)200mlで洗浄後、再度遠心分離し、洗浄菌体を得た。

【0080】

(2) L-エピーイノソース-2の生成と単離

上記により得られた洗浄菌体35gを、ミオーイノシトール4gを溶解、含有した0.05M リン酸緩衝液(pH7.0)400ml(ミオーイノシトール濃度10mg/ml)中に加えた。得られた反応混合物を4時間緩やかにスターラーで攪拌しながら反応させた。ミオーイノシトールの酸化の反応終了後、反応液から菌体を除去した。残りの反応液を液体クロマトグラフィーにより分析したところ、L-エピーイノソース-2が6mg/mlの濃度(L-エピーイノソース-2の反応収率60.6%)で反応液中に蓄積していた。

【0081】

反応液の400mlからL-エピーイノソース-2を単離した。その単離は、実施例1、(2)に記載した方法に準じて行い、結晶としてL-エピーイノソース-2の1608mg(回収収率67%)を得た。なお、上記のL-エピーイノソース-2の回収収率は、次式により求めた。

回収収率(%) = [結晶として単離したL-エピーイノソース-2の量 ÷ 反応液400mlに含まれたL-エピーイノソース-2の量] × 100

【0082】

(3) エピーイノシトールの生成と単離

前項(1)で得た菌体をリン酸緩衝液中でミオーイノシトールに反応させる前項(2)の方法を反復した。これにより、L-エピーイノソース-2を6mg/mlの濃度で

含有する緩衝液を得た。得られたL-エピーイノソース-2含有の緩衝液から菌体を除去した。菌体を除去した反応液400mlに0.16gの水素化ホウ素ナトリウムを徐々に加えた。反応温度を5℃以下に調整しながら、L-エピーイノソース-2の還元を行った。還元反応終了後、得られた反応液を高速液体クロマトグラフィーで定量分析した結果、この反応液中に、エピーイノシトールが1.4g生成していることがわかった。

この還元反応液から、後記の実施例4、(4)に記載したクロマトグラフィー的方法でエピーイノシトールおよびミオーイノシトールを回収し、次いで、順次単離および精製することにより、0.85gのエピーイノシトールを結晶として得た。

【0083】

実施例4

実施方法(B)によるエピーイノシトールの製造例

(1) L-エピーイノソース-2の生成

ミオーイノシトール 25.0%(500g)、および炭素源としてのグルコース 1.0%、有機栄養源としての酵母エキス 2.5%を含むpH未調整の液体培地の2リットルを、100mlずつ500ml容のバッフル付き三角フラスコに分注し、オートクレーブ滅菌した。各々の三角フラスコにキサントモナス・エスピーAB10119株を接種し、27℃で5日間振とう培養した。培養液を遠心分離(8,000rpm、20分間)して菌体を除去し、得られた上清を培養上清液とした。

この培養上清液を実施例1、(1)に示した高速液体クロマトグラフィーにより実施例1、(1)に示したHPLC条件で分析した。その結果、培養上清液の2リットル中にはL-エピーイノソース-2が415.0g(ミオーイノシトールからのL-エピーイノソース-2の反応収率83.9%)の量で生成していることがわかった。

【0084】

(2) エピーイノシトールの生成

前項(1)で得たL-エピーイノソース-2含有の培養上清液の2リットルに水素化ホウ素ナトリウム29.2gを徐々に加えた。反応温度を5℃以下に調整しながらL-エピーイノソース-2の還元を行った。還元終了後、培養上清液(反応液)を高速液体クロマトグラフィーにより下記のHPLC条件で分析した。その結果、還元反

応後の反応液(培養上清液)は、生成したエピーイノシトールの235.8gを含有し、副生成物としてミオーイノシトールの102.4gを含有していることがわかった(エピーイノシトールとミオーイノシトールの合計収率80.5%)。L-エピーイノソース-2からのエピーイノシトールの反応収率は56.2%であった。

【0085】

高速液体クロマトグラフィーによる分析のHPLC条件は次のとおりである。

カラム: Wakosil 5NH₂: 4.6×250mm

カラム温度: 40℃

検出器: RI DETECTOR ERC-7515A (ERMA CR. INC.)

注入量: 20 μl

溶媒: アセトニトリル-水=4:1

溶出時間: エピーイノシトールについて8.5分

【0086】

エピーイノシトールとミオーイノシトールの合計収率(%) = [還元反応後の培養上清液中のエピーイノシトールのモル数とミオーイノシトールのモル数の合計 ÷ 還元反応前の培養上清液中のL-エピーイノソース-2のモル数] × 100

また、上記のL-エピーイノソース-2からのエピーイノシトールの反応収率は次式により求めた。

反応収率(%) = [還元反応後の培養上清液中のエピーイノシトールのモル数 ÷ 還元反応前の培地中のL-エピーイノソース-2のモル数] × 100

【0087】

(3) エピーイノシトールの単離の第1例

前項(2)で得た還元反応後の反応液(培養上清液)を二等分した。一方の液を強酸性陽イオン交換樹脂デュオライト(登録商標)C-20(H⁺型)300mlを充填したカラム(内径5cm、長さ30cm)に通過させ、その通過液を集めた。その後このカラムに400mlの脱イオン水を通過させ洗浄して洗浄液を集めた。この通過液及び洗浄液を合併して、その混合物を強塩基性陰イオン交換樹脂デュオライト(登録商標)A-113(OH⁻型)600mlを充填したカラム(内径5cm、長さ60cm)に通過させ、その通過液を集めた。その後このカラムに700mlの脱イオン水を通過させて洗浄して洗浄液を

集めた。

【0088】

こうして得られた通過液及び水洗浄液を合併して得られた水溶液は、エビーイノシトールと副生成物であるミオーイノシトールを含有するが、これら以外の不純物をほとんど含有しなかった。

上記により得た水溶液を減圧下で300mlまで濃縮し、その濃縮液(300ml)の4分の1量(75ml)を強塩基性陰イオン交換樹脂アンバーライト(登録商標)CG-400(OH⁻型)1500mlを充填したカラム(内径5cm、長さ900cm)に通過させ、その通過液を集めた。その後このカラムに脱イオン水を通過させて溶出した。該カラムからの溶出液はミオーイノシトールを主として含む画分と、所望なエビーイノシトールを主として含む画分とに分けて集めた。前記の濃縮度の残りの4分の3(225ml)についても同様な操作を行うにより、エビーイノシトールを専ら含む溶出液を取得できた。これを濃縮乾固してエビーイノシトールの73gを得た。更にこのエビーイノシトールを水に溶かし15%の水溶液とした後、エタノールを2倍量加えて5℃で一晩放置した。こうして純粋なエビーイノシトールの結晶63gを得た(回収率53%)。

【0089】

なお、上記エビーイノシトールの回収率は次式により求めた。

回収率(%) = [結晶として単離したエビーイノシトールの重量 ÷ 還元反応後の上清液中のエビーイノシトールの重量] × 100

【0090】

(4)エビーイノシトールの単離の第2例

前項(3)で二等分された還元反応後の反応液(培養上清液)の残りの一方を、強酸性陽イオン交換樹脂デュオライト(登録商標C-20(H⁺型)300mlを充填したカラム(内径5cm、長さ30cm)に通過させその通過液を集めた。その後このカラムに400mlの脱イオン水を通過させ洗浄して洗浄液を集めた。この通過液及び洗浄液を合併して、その混合物を強塩基性陰イオン交換樹脂デュオライト(登録商標)A-113(OH⁻型)600mlを充填したカラム(内径5cm、長さ60cm)に通過させ、その通過液を集めた。その後このカラムに700mlの脱イオン水を通過させて洗浄して洗浄液を集

めた。

【 0 0 9 1 】

上記により得たカラム通過液と洗浄液を合併して得た水溶液を減圧下で300mlまで濃縮した。その濃縮液を強酸性陽イオン交換樹脂ダイヤイオン(登録商標)UB K520M(Ca^{2+} 型)1500mlを充填したカラム(内径5cm、長さ900cm)に通過させ、その通過液を集めた。その後このカラムに脱イオン水を通して溶出した。溶出液は、ミオーイノシトールを主として含む画分と、エビーイノシトールを主として含む画分とに分けて集めた。このクロマトグラフィー操作で、エビーイノシトールを75g得た。更にこのエビーイノシトールを水に溶かし、15%の水溶液とした後、エタノールを2倍量加え5℃で一晩放置した。こうして純粋なエビーイノシトールの結晶66gを得た(回収収率56%)。

なお、上記のエビーイノシトールの回収収率は前項(3)と同様に計算した。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 各種の医薬として有用なエピーイノシトールを安価なミオーイノシトールから効率よく製造できる新方法を提供することを目的とする。

【解決手段】 ミオーイノシトールをL-エピーイノソース-2へ変換できる変換能を有するグラム陰性細菌をミオーイノシトールに作用させて、前記ミオーイノシトールのL-エピーイノソース-2への変換によりL-エピーイノソース-2を生成する工程と、さらにL-エピーイノソース-2に水性反応媒質中で水素化ホウ素アルカリ金属またはその他のアルカリ金属水素化物を還元剤として反応させて、エピーイノシトールとミオーイノシトールを生成させる工程と、得られた還元反応生成物からエピーイノシトールを分離および単離する工程を有する、エピーイノシトールの新規な製造方法が提供される。

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000242002]

1. 変更年月日	1990年 8月 6日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都中央区日本橋本石町4丁目4番20号
氏 名	北興化学工業株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000173913]

1. 変更年月日 1990年 8月10日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都品川区上大崎3丁目14番23号

氏 名 財団法人微生物化学研究会